

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

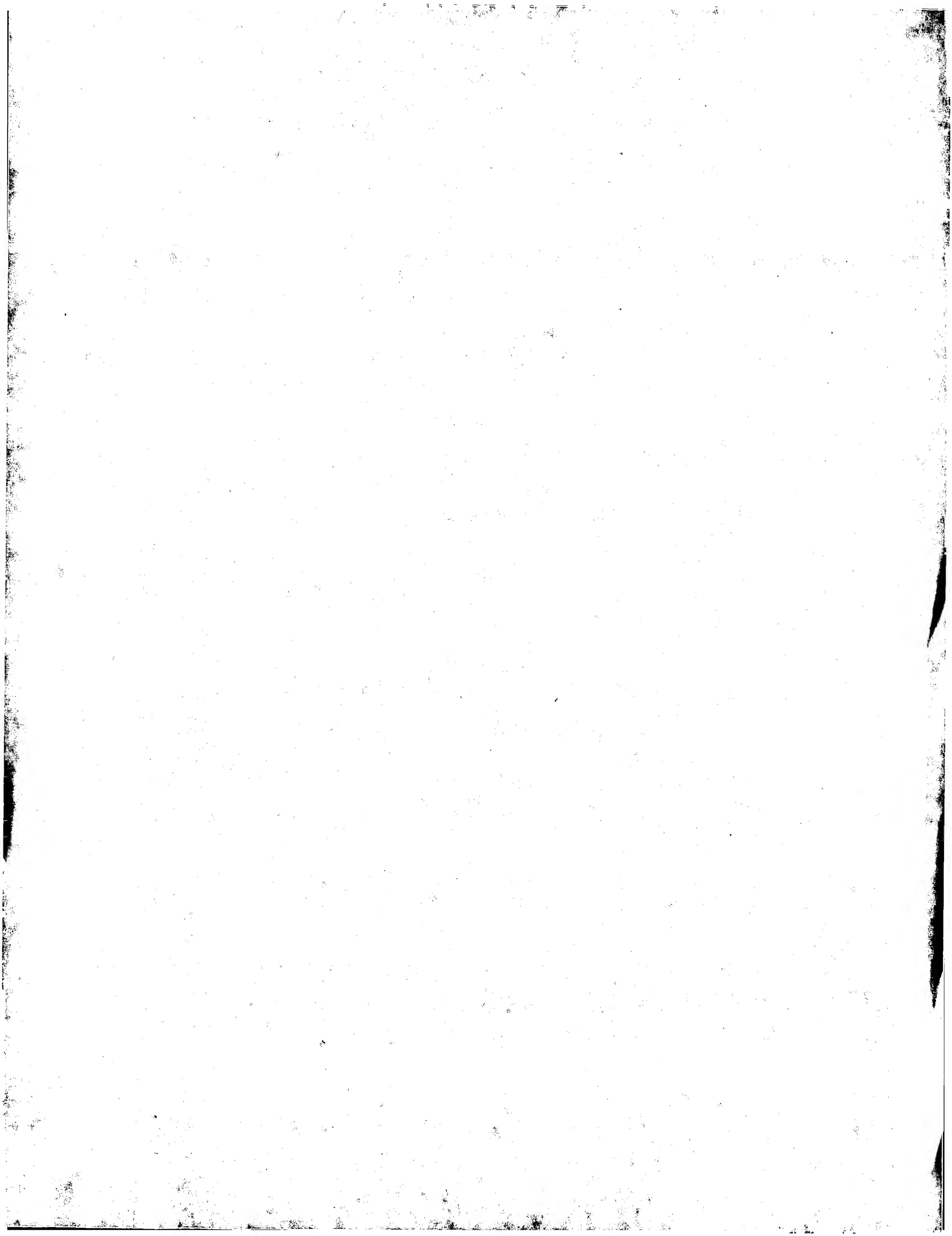
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|--|----|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation 6 : C07K 16/00 | A2 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/22508 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Mai 1998 (28.05.98) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/06382 | | (81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 15. November 1997 (15.11.97) | | |
| (30) Prioritätsdaten: 196 48 209.7 21. November 1996 (21.11.96) DE | | Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; D-55216 Ingelheim am Rhein (DE). | | |
| (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HANDGRETINGER, Rupert [DE/DE]; Klopstockweg 16, D-72076 Tübingen (DE). NEU, Stefan [DE/DE]; Theodor-Heuss-Strasse 9, D-72108 Rottenburg (DE). | | |
| (74) Anwälte: LAUDIEN, Dieter usw.; Boehringer Ingelheim GmbH, A Patente, Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE). | | |

(54) Title: PROCESS FOR TUMOUR CELL DEPLETION OF CD34-POSITIVE CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR TUMORZELLDEPLETION CD34-POSITIVER ZELLEN

(57) Abstract

A process for selectively eliminating (purging) tumour cells from preparations containing CD34-positive cells using CD44-specific antibodies is disclosed. The invention is based on the surprising discovery that CD34-positive cells, unlike many tumour cells, do not express the variant exons CD44v5 and CD44vt, or only to a very minor extent. A new molecular marker is thus provided by means of which tumour cells that contaminate strain cell preparations can be selectively destroyed. To destroy tumour cells, CD44v-specific antibody molecules can be linked to a cytotoxic agent, for example the exotoxin of the species *pseudomonas*.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur selektiven Entfernung (purging) von Tumorzellen aus Präparationen, die CD34-positive Zellen enthalten, mit Hilfe CD44-spezifischer Antikörper. Diese Aufgabe konnte auf Grundlage des überraschenden Befundes gelöst werden, daß CD34-positive Zellen im Gegensatz zu vielen Tumorzellen die varianten Exons CD44v5 und CD44v6 nicht oder in sehr geringem Maße exprimieren. Damit wird ein neuer molekularer Marker bereitgestellt, mit dessen Hilfe kontaminierende Tumorzellen in Stammzellpräparationen selektiv zerstört werden können. Zur Zerstörung der Tumorzellen können CD44v-spezifische Antikörpermoleküle mit einem zytotoxischen Agens verknüpft werden, beispielsweise mit dem Exotoxin der Gattung *Pseudomonas*.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |

Verfahren zur Tumorzelldepletion CD34-positiver Zellen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur selektiven Entfernung (purgung) von Tumorzellen aus Präparationen, die CD34-positive Zellen enthalten, mit Hilfe CD44-spezifischer Antikörper.

Autologe Knochenmarktransplantation ist nicht nur bei Therapie von Leukämie, sondern auch in der Therapie solider Tumoren von steigender Wichtigkeit. Der Nutzen autologer Knochenmarktransplantationen wird durch ein erhöhtes Rezidivrisiko im Verlauf der Knochenmarksrekonstitution beeinträchtigt. Dieser Rückfall könnte von malignen Zellen herstammen, die die Knochenmarksfraktion in unterschiedlichem Maße kontaminieren (1, 2, 3).

Es existieren verschiedene Strategien, die Kotransplantation maligner Tumorzellen bei der autologen Transplantation zu verhindern. Die gebräuchlichste Methode, die Tumormasse zu reduzieren, ist Knochenmarksreinigung (bone marrow purging). Knochenmarkszellen werden mechanischen oder chemischen Verfahren unterworfen (4). Damit kann eine Verringerung der malignen Zellen um Werte von 3 bis mehr als 5 log erreicht werden (5, 4, 6), jedoch werden die malignen Zellen nicht in jedem Falle ausgerottet. Eine kürzlich angewandte Methode ist die Anreicherung und Reinfusion von hämatopoetischen Stammzellen. Im Menschen exprimieren hämatopoetische Stammzellen CD34. Es wurden verschiedene Ansätze entwickelt, CD34-positive Zellen erfolgreich zu isolieren, wobei Immunoabsorbens-, immunomagnetische oder Zentrifugationsverfahren verwendet werden (7). Bis heute ist es kaum möglich, die gewünschte Zellpopulation im klinischen Maßstab bis zur Homogenität anzureichern. Dieses Erfordernis sollte erfüllt werden, um das Risiko kontaminierender Zellen auszuschließen. Obwohl also Reinigungsverfahren und Stammzellanreicherungsstrategien verwendet werden, besteht immer noch das Risiko minimaler übrigbleibender Erkrankung (minimal residual disease) bei autologer Transplantation.

Eine vielversprechende neue Strategie der Eliminierung oder Minimierung residualer maligner Zellen könnte aus der Kombination von Reinigungsmethoden und Stammzellanreicherung resultieren. Jedoch fehlt es dafür an tumorspezifischen Markern, d.h. Antigenen, die auf Tumorzellen, jedoch nicht auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert werden.

CD44 ist ein verbreitetes Antigen, das von verschiedenen Zellen exprimiert wird (8), darunter T-Zellen, Granulozyten und Thymozyten. CD44 ist als Hyaluronsäurerezeptor bekannt (9). Eine komplexe genomische Organisation mit wenigsten 20 Exons ist für die

Erzeugung verschiedener Spleißvarianten verantwortlich (10, 8). Bis heute sind 15 verschiedene Spleißtypen von CD44 bekannt. Um zwischen dem Standardrezeptorphänotyp und den gespleißten Phänotypen zu unterscheiden, wurde der gewöhnlich exprimierte Hyaluronsäurerezeptor CD44s benannt, während alle Spleißvarianten mit CD44v bezeichnet wurden (8, 11). Alle Spleißvarianten sind länger und tragen zusätzliche extrazelluläre Proteindomänen. Die Erzeugung von CD44-Spleißvarianten scheint mit Prozessen der Aktivierung, Entzündung und Tumorprogression korreliert zu sein (12, 13, 14, 15). Möglicherweise in Analogie zu ihrer Funktion bei der Lymphozytenmigration wurde für variante CD44-Moleküle gezeigt, daß sie metastatische Fähigkeiten in Rattentumorzelllinien hervorrufen können (16). Homologe dieser Varianten, insbesondere CD44v5 und CD44v6 wurden in verschiedenen menschlichen malignen Erkrankungen detektiert, darunter Non-Hodgkin's Lymphom (17), Brust (18), Magen (19) und Kolon (20), wo sie sowohl mit Tumorprogression und Tumorausbreitung als auch mit einer schlechten Prognose der Patienten in Verbindung gebracht werden.

Die Erzeugung von CD44v5 und CD44v6 ist nicht auf metastasierende Zellen beschränkt, sondern die Expression dieser Spleißvarianten scheint ein allgemeines Muster der Immunabwehr zu sein (21). CD44v5 und CD44v6 sind einerseits für die Metastasenbildung verantwortlich (8, 22) und werden auf der anderen Seite von immunokompetenten Zellen exprimiert.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, verbesserte Verfahren zur Immunreinigung CD34-positiver Zellen (CD34+) bereitzustellen.

Diese Aufgabe konnte auf Grundlage des überraschenden Befundes gelöst werden, daß CD34-positive Zellen im Gegensatz zu vielen Tumorzellen die varianten Exons CD44v5 und CD44v6 nicht oder in sehr geringem Maße exprimieren. Damit wird ein neuer molekularer Marker bereitgestellt, mit dessen Hilfe kontaminierende Tumorzellen in Stammzellpräparationen selektiv zerstört werden können.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines für variantes CD44 spezifischen Antikörpermoleküls zur selektiven Entfernung von Tumorzellen aus einer Zellpräparation, die hämatopoetische Stamm- und/oder Vorläuferzellen enthält. Insbesondere betrifft dies Zellpräparationen, die hämatopoetische Stamm- und/oder Vorläuferzellen enthalten, die CD34 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Solche Zellpräparation können aus Knochenmark, peripherem Blut, Nabelschnurblut oder Leukapheresematerial erhalten werden. Bei der Herstellung der Zellpräparation können CD34+ -Zellen selektiv angereichert werden, etwa durch immunoabsorbierende, immunomagnetische oder Zentrifugationstechniken,

beispielsweise durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) oder magnetische Zellseparation (MACS).

Insbesondere kann für die erfindungsgemäße Verwendung ein Antikörpermolekül verwendet werden, das spezifisch für ein Epitop ist, das durch das variante Exon v5 und/oder das variante Exon v6 des CD44 Gens kodiert wird. Ein solches Antikörpermolekül kann ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper sein, ein komplettes Immunoglobulin oder aber auch ein Fragment davon, z.B., ein Fab-Fragment. Es kann sich dabei auch um ein hybrides oder chimäres ein- oder mehrketiges und/oder durch Expression rekombinanter DNA hergestelltes Antikörpermolekül handeln, das die angegebene Spezifität aufweist. Besonders bevorzugt ist der monoklonale Antikörper VFF-18, der von einer Hybridomazelllinie sezerniert wird, die am 07.06.1994 unter dem Aktenzeichen DSM ACC2174 bei der DSM-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland, hinterlegt wurde (WO 95/33771).

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Antikörpermoleküle mit der beschriebenen Spezifität, die mit einem zytotoxischen Agens verknüpft sind, beispielsweise mit einem Toxin, vorzugsweise einem bakteriellen Toxin. Besonders bevorzugt ist dabei das Exotoxin der Gattung *Pseudomonas*. Das Toxin kann mit dem Antikörpermolekül kovalent verknüpft sein oder durch rekombinante Expression eines Antikörper-Toxin Fusionsproteins hergestellt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft gleichermaßen Verwendungen von Antikörpermolekülen mit der beschriebenen Spezifität zur selektiven Entfernung von Tumorzellen aus einer Zellpräparation, die hämatopoetische Vorläuferzellen enthält, indem die Tumorzellen selektiv auf einem festem Träger, der beispielsweise magnetisch sein kann, immobilisiert werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Entfernung von Tumorzellen aus einer Zellpräparation, die hämatopoetische Vorläuferzellen enthält, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die Zellpräparation mit einem für variantes CD44 spezifischen Antikörpermolekül in Kontakt gebracht wird.

Ein solches Verfahren kann beispielsweise dadurch gekennzeichnet sein, daß das Antikörpermolekül mit einem zytotoxischen Agens verknüpft ist.

Ein solches Verfahren kann auch dadurch gekennzeichnet sein, daß zur Entfernung der Tumorzellen ein fester Träger verwendet wird.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Zellpräparation, die nach einem der beschriebenen Verfahren erhältlich ist.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer wie vorstehend beschrieben gereinigten Zellpräparation zur Transplantation, insbesondere zur autologen Knochenmarktransplantation.

Die Nuklein- und Aminosäuresequenz der varianten Exons des CD44-Gens ist bekannt (13, 29, 30). Die Existenz degenerierter oder alleler Varianten ist für die Ausführung der Erfindung nicht von Bedeutung; solche Varianten sind daher ausdrücklich mit eingeschlossen.

Die Sequenz von Exon v5 des menschlichen CD44-Gens ist:

15 (D) V D R N G T T A Y E G N W
(CAG) AT GTA GAC AGA AAT GGC ACC ACT GCT TAT GAA GGA AAC TGG

N P E A H P P L I H H E H H E
AAC CCA GAA GCA CAC CCT CCC CTC ATT CAC CAT GAG CAT CAT GAG

20 E E E T P H S T S T
GAA GAA GAG ACC CCA CAT TCT ACA AGC ACA A.

25 Die Sequenz von Exon v6 des menschlichen CD44-Gens ist:

Q A T P S S T T E E T A T Q
TC CAG GCA ACT CCT AGT AGT ACA ACG GAA GAA ACA GCT ACC CAG

30 K E Q W F G N R W H E G Y R Q
AAG GAA CAG TGG TTT GGC AAC AGA TGG CAT GAG GGA TAT CGC CAA

T P R E D S H S T T G T A
ACA CCC AGA GAA GAC TCC CAT TCG ACA ACA GGG ACA GCT G.

35 Die Herstellung von Antikörpern gegen bekannte Aminosäuresequenzen kann nach an sich bekannten Methoden erfolgen (28). Beispielsweise kann ein Peptid dieser Sequenz

synthetisch hergestellt und als Antigen in einem Immunisierungsprotokoll eingesetzt werden. Ein anderer Weg ist die Herstellung eines Fusionsproteins, das die gewünschte Aminosäuresequenz enthält, indem eine Nukleinsäure (die synthetisch oder z.B. durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus einer geeigneten Probe hergestellt werden kann), die für diese Sequenz kodiert, in einen Expressionsvektor integriert und das Fusionsprotein in einem Wirtsorganismus exprimiert wird. Das gegebenenfalls gereinigte Fusionsprotein kann dann als Antigen in einem Immunisierungsprotokoll eingesetzt und Insert-spezifische Antikörper oder, im Falle monoklonaler Antikörper, Hybridome, die insertspezifische Antikörper exprimieren, mit geeigneten Verfahren selektiert werden. Solche Verfahren sind Stand der Technik. Heider *et al.* (27) und Koopman et al. (17) beschreiben die Herstellung von Antikörpern gegen variante Epitope von CD44. Antikörper gegen Epitope, die durch die Exons v5 und v6 kodiert werden, werden insbesondere in den Patentanmeldungen WO 95/00851 und WO 95/33771 beschrieben.

Antikörper, die für CD44v5 und/oder CD44v6 spezifisch sind, können mit einem zytotoxischem Agens, beispielsweise einem Toxin verknüpft werden. Geeignet sind beispielsweise Ricin, insbesondere rekombinante Ricin-A-Kette oder Abrin A. Besonders geeignet ist das *Pseudomonas*-Exotoxin. Das Toxin kann mit dem Antikörpermolekül kovalent verknüpft sein, beispielsweise über eine Thioetherbindung unter Verwendung des Koppelungsgens Sulfo-succinimidyl-4(N-maleimidomethyl)cyclo-hexan-1-carboxylat (vgl. Beispiel 2).

Es kann aber auch beispielsweise ein Antikörper/Toxin-Fusionsprotein verwendet werden. Verfahren zur Herstellung solcher Fusionsproteine sind im Stand der Technik beschrieben (31, 32).

Auch die Verwendung eines Antikörper-Zytostatikum-Konjugats ist möglich. Verfahren zur Herstellung von Antikörper-Zytostatikum-Konjugaten sind im Stand der Technik beschrieben (33).

Zellpräparationen, die hämatopoetische Vorläuferzellen enthalten, können beispielsweise in einem geeigneten Zellkulturmedium in einer Konzentration von 10^6 - 10^8 Zellen/ml bei einer Temperatur von 37°C suspendiert, mit 0.01 - 10 µg/ml Antikörper-*Pseudomonas*-Exotoxin-Konjugat versetzt und 0.5 bis 20 Stunden, vorzugsweise 1 bis 2 Stunden, bei 37°C inkubiert werden. Vorzugsweise beträgt die Antikörper-Toxin-Konzentration 0.1 - 5 µg/ml, besonders bevorzugt 0.5 - 1 µg/ml. Anschließend können die Zellen mit Kulturmöglichkeit gewaschen werden. Das Vorhandensein überlebender Tumorzellen kann in einem Koloniebildungsversuch (vgl. Beispiel 3) getestet und die Prozedur gegebenenfalls wieder-

holt werden. Die Überlebensrate klonogener hämatopoetischer Vorläuferzellen kann ebenfalls in einem entsprechenden Assay getestet werden (vgl. Beispiel 3).

Ein anderer Weg, die Erfindung auszuführen, besteht in einer immunomagnetischen Reinigung. Zellpräparationen, die hämatopoetische Vorläuferzellen enthalten, können beispielsweise in einem geeigneten Zellkulturmedium in einer Konzentration von 10^6 - 10^8 Zellen/ml suspendiert, mit 0.1 - 20 µg/ml eines entsprechenden CD44-Antikörpers und unter leichter Bewegung (Rollen oder Schütteln) beispielsweise für 10 bis 90 min, vorzugsweise für 30 min. unter Kühlung, z.B. bei 4°C inkubiert werden. Anschließend können die Zellen gewaschen und dann mit einem magnetischen sphärischen Trägermaterial versetzt werden, das mit einem Antikörper, der den verwendeten CD44-Antikörper binden kann, beschichtet ist. Solche Trägermaterialen sind im Handel erhältlich (vgl. Beispiel 3). Es schließt sich daran eine erneute Inkubation an, beispielsweise wieder für 30 min bei 4°C unter leichter Bewegung. Dabei binden die Tumorzellen über die Antikörper-Antikörper-Wechselwirkung an den Träger. Der Träger mitsamt den spezifisch gebundenen Tumorzellen kann dann mit Hilfe eines Magneten entfernt werden.

Die vorliegende Erfindung ist nicht auf die beschriebenen Ausführungsformen beschränkt. Sie schließt weitere Ausführungsformen von Verfahren zur Abtrennung von Tumorzellen aus den genannten Zellpräparationen ein, deren Kernelement die spezifische Wechselwirkung von CD44v5/CD44v6-Antikörpermolekülen mit Tumorzellen ist.

Abbildungen

Fig. 1a-e: Durchflußzytometrische Analyse angereicherter CD34+-Zellen, isoliert aus Nabelschnurblut. Die Analyse wurde mit einem FACScan (Becton Dickinson) durchgeführt. 5000 Zellen wurden untersucht. Gezeigt ist ein Punktdiagramm (dot blot) der Fluoreszenzintensitäten (Fluoreszenz 1 (grün) gegen Fluoreszenz 2 (rot)).

Fig. 1a: Kontrollfärbung angereicherter Zellen mit nichtspezifischen Fluorochrom-markierten Antikörpern (IgG1-FITC und IgG2a-PE).

Fig. 1b: Färbung angereicherter Zellen mit dem CD34-spezifischen Antikörper HPCA-2-FITC (grün).

Fig. 1c: Färbung angereicherter Zellen mit CD34-spezifischem HPCA-2-FITC (grün) und CD44s-spezifischem SFF-2-Biotin-Streptavidin-PE (rot).

Fig. 1d: Färbung angereicherter Zellen mit CD34-spezifischem HPCA-2-FITC (grün) und CD44v5-spezifischem VFF-8-Biotin-Streptavidin-PE (rot).

Fig. 1e: Färbung angereicherter Zellen mit CD34-spezifischem HPCA-2-FITC (grün) und CD44v6-spezifischem VFF-18-Biotin-Streptavidin-PE (rot).

Fig. 2: Durchflußzytometrische Analyse angereicherter CD34+-Zellen, isoliert aus Nabelschnurblut. Die Analyse wurde mit einem FACScan (Becton Dickinson) durchgeführt. 5000 Zellen wurden analysiert. Gezeigt ist ein Punktdiagramm der Lichtstreuungseigenschaften (Vorwärtsstreuung gegen Seitwärtsstreuung).

Fig. 3: Expression von CD44s, CD44v5 und CD44v6 in CD34+-Zellen, isoliert aus Leukapheresematerial. Gezeigt ist die Antigenexpression individueller Proben.

Fig. 4: Expression von CD44s, CD44v5 und CD44v6 in CD34+-Zellen, isoliert aus Nabelschnurblut. Gezeigt ist die Antigenexpression individueller Proben.

Fig. 5: Expression von CD44s, CD44v5 und CD44v6 in CD34+-Zellen, isoliert aus Knochenmark. Gezeigt ist die Antigenexpression individueller Proben.

Beispiele

Beispiel 1: Expression von CD44s und CD44v auf CD34+-Zellen

Gewinnung von Nabelschnurblut und Isolierung mononukleärer Zellen

Bis zu 50 ml frisch erhaltenes Nabelschnurblut wurde mit 300 I.U. Heparin-Natrium (Promonta, Hamburg, Deutschland) vermischt. Mononukleäre Zellen wurden angereichert, wobei eine modifizierte Methode der Dichte-Sedimentation verwendet wurde. Blut, das nicht älter als 6 Stunden war, wurde 1:2 mit Phosphat-gepufferter Salzlösung, PBS (Gibco, Renfrewshire, UK), verdünnt, die 5 mM EDTA enthielt. Als Trennmedium wurde Lymphoprep (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen) mit einer Dichte $d=1.077$ verwendet. Die Zentrifugation wurde bei $800 \times g$ für 15 Min. ausgeführt. Die Fraktion der mononukleären Zellen wurde zweimal mit PBS/EDTA gewaschen.

Probenherstellung von Leukapheresematerial und Knochenmark

Cryokonserviertes Leukapheresematerial wurde schnell bei 37°C getaut und sofort in RPMI 1640/10% FCS (Hyclone, Cramlington, UK) resuspendiert. RPMI1640 (Biochrom, Berlin, Deutschland) wurde ohne Indikatorfarbstoff verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit RPMI1640 gewaschen. Frisch erhaltenes Leukapheresematerial und Knochenmarksproben wurden einmal mit RPMI1640 gewaschen. Um Klumpen zu entfernen, wurde das Material mit 0.02 % Kollagenase (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), Typ V, und 200 U/ml DNase (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) verdaut. Der Verdau wurde für 45 - 90 Min. bei Raumtemperatur ausgeführt, wobei die Zellsuspension sanft geschüttelt wurde. Zellen wurden durch ein 40 μm Nylonzellenfilter (Becton, Dickinson, San Jose, California) filtriert. Weitere Informationen zum benutzten Leukapheresematerial können Tabelle I entnommen werden. Knochenmarksproben wurden von gesunden Donoren erhalten.

CD34-spezifische Färbung mononukleärer Zellen

Isolierte mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut sowie enzymatisch behandelte Zellen (Leukapherese/Knochenmarksproben) wurden in Markierungspuffer resuspendiert, der PBS/5 mM EDTA/0.5 % BSA (Gibco) enthielt. CD34-Markierung wurde mit einem CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt. CD34-spezifische Markierung von Zellen wurde gemäß der Herstellerangaben durchgeführt (23).

Magnetische positive Selektion von CD34+-Zellen

Antikörpermarkierte Zellen wurden in entgastem Markierungspuffer resuspendiert. Die Trennung wurde durchgeführt, wobei ein magnetisches Trennungssystem (23, 24) verwendet wurde, magnetische Zellseparation MACS (Miltenyi Biotec). Zellen wurden in der Anwesenheit eines starken Magnetfeldes auf MiniMACS-Säulen, Typ MS, gegeben. Die Säulen wurden viermal mit Markierungspuffer gewaschen, gefolgt von der Elution mit Markierungspuffer in Abwesenheit eines Magnetfeldes. Zur Elution wurde ein Spritzenstempel benutzt. Mit einer zweiten Säule wurden die Zielzellen weiter gereinigt, wobei zwei Waschschritte angewendet wurden. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde durch Durchflußzytometrie bestimmt. Fluorochrom-markierte Antikörper (alle von Becton Dickinson) wurden wie folgt appliziert: Unspezifische Kontrollantikörper (IgG1-FITC und IgG2a-PE), CD34-FITC (HPCA-2-FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)) und CD34-PE (HPCA-2-PE).

15

Färbung von CD34+-Zellen mit CD44-spezifischen Antikörpern

Angereicherte Zielzellen aus Nabelschnurblut oder Leukapheresematerial wurden mit kaltem PBS (Gibco) gewaschen. Zellen wurden in Immunofluoreszenzpuffer, der 5 % Polylglobin N (Troponwerke, Köln, Deutschland) und 0.05% NaN₃ enthielt, resuspendiert. CD44-spezifische Antikörper (Tabelle II) wurden von Bender & Co. GesmbH (Wien, Österreich) bezogen. CD34-/CD44-Doppelfluoreszenzfärbung (FITC/PE- oder FITC/Biotin-markierte Antikörper) wurde gleichzeitig durchgeführt, wobei ein CD34-spezifischer Antikörper und ein CD44-Antikörper der Wahl benutzt wurde. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 30 Min. in der Dunkelheit. Zellen wurden zweimal mit PBS (4°C) gewaschen. Proben, die mit Biotin markiertem CD44-Antikörper gefärbt wurden, wurden in Immunofluoreszenzpuffer resuspendiert und mit Streptavidin-PE (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) bei einer Konzentration von 5µg/ml inkubiert. Die Inkubation wurde bei 4°C für 30 Min. in der Dunkelheit ausgeführt. Zellen wurden zweimal mit PBS (4°C) gewaschen und bis zur durchflußzytometrischen Analyse auf Eis gehalten.

Um die Leistung und Verlässlichkeit des Färbungssystems zu testen, wurden die Zelllinien CCRF CEM (ATCC CLL 119), Jurkat (ATCC TIB 152) und MOLT-4 (ATCC CRL 1582) sowie Phytohämagglutinin-stimulierte Lymphozyten eines gesunden Freiwilligen benutzt.

Durchflußzytometrische Analyse

Die Erhebung der Daten erfolgte unter Benutzung eines Single-Argon-Laser-Durchflußzytometers, FACScan (Becton Dickinson), das Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm. emittierte. Die Analyse wurde mit einem PC-Lysys (Becton Dickinson), Software Version 1.0 und 1.1, auf einem IBM-kompatiblen Personalcomputer durchgeführt. Verschiedene Populationen von CD44-positiven und CD44-negativen Zellen wurden unter Verwendung von Dual Parameter Statistics in einem Punktdiagramm von grüner Fluoreszenz gegen rote Fluoreszenz unterschieden (Fig. 1 a-e).

10

Reinheit von CD34+-Zellen, angereichert aus Nabelschnurblut, Leukapheresematerial und Knochenmarksproben

15 8 Nabelschnurblutproben, 7 Proben aus Leukapheresen und 4 Knochenmarksproben wurden prozessiert. Im Vergleich mit nichtseparierten mononukleären Zellen zeigten isolierte Zellen ein anderes Lichtstreuungssignal (Fig. 2): Zellen, die der magnetischen Zellsortierung unterworfen worden waren, zeigten höhere Werte der Vorwärtsstreuungssignale. Die Reinheit wurde durch FACS-Analyse untersucht. Die Prozentsätze von CD34+ -Zellen wurden bestimmt. Mittelwerte (mittel \pm SD) waren wie folgt: Nabelschnurblut 96.1 ± 2.4 %, Leukapherese 98.6 ± 0.9 % und Knochenmarksproben 96.2 ± 0.5 %.

25

Durch Benutzung logischer Gates wurde die durchflußzytometrische Analyse der CD44-Expression auf CD34-positive Zellen beschränkt. Individuelle Proben von CD34+-Zellen aus Nabelschnurblut (Fig. 3), Leukapherese (Fig. 4) und Knochenmark (Fig. 5) zeigten schwache Expression der untersuchten CD44-Varianten CD44v5 und CD44v6. Mit mittleren Werten von 0.6 % in Proben von Knochenmark (Bereich 0.1 - 0.9 %) zeigte dieses Gewebe nur eine marginale Expression der Spleißvariante CD44v5, und nur leicht erhöhte Werte wurden in Proben aus Leukapheresen (Mittel 1.3 %, Bereich 0.3 - 2.7 %) und Nabelschnurblut (Mittel 1.4 %, Bereich bis zu 3.2 %) gefunden. Im Vergleich mit der CD44v5-Expression wurde eine höhere Expression von CD44v6 in allen Typen von Proben gefunden, mit einer moderaten Zunahme in Proben aus Leukapheresen (1.4mal höhere CD44v6-Expression), und einer größeren Zunahme in Knochenmark und Nabelschnurblutproben (2.5mal höher). Höhere Mittelwerte der CD44v6-Expression wurden von einem breiten Bereich der Proben von Knochenmark (Mittel 1.5%, Bereich 0.3 - 2.4), Leukaph-

rese (Mittel 1.8 %, Bereich 1.1 - 2.7), und Nabelschnurblut (Mittel 3.6 %, Bereich 1.9 - 8.1) begleitet.

Im Gegensatz zur schwachen Expression von CD44-Spleißvarianten gab es eine starke Expression der Standardform CD44s in allen untersuchten Probentypen. Mit Mittelwerten von 98.6 % (Leukapherese), 98.8% (Nabelschnurblut) zeigten fast alle Zellen CD44s Expression, im Knochenmark erreichte der Mittelwert das Maximum von 100%.

Allgemein wurde die niedrige Expression von CD44v und die hohe Expression von CD44s bestätigt (Tabelle III).

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere auch eine zweistufige Behandlung. In dem ersten Schritt werden CD34+ -Zellen immunomagnetisch angereichert und im zweiten Schritt einer Immunreinigung (Immunopurging) unterworfen. Dabei können vorteilhaft Antikörper, die spezifisch für CD44v5 und CD44v6 sind bei der Immunreinigung verwendet werden.

Tabelle I: Probenbeschreibung des Leukapheresematerials

20

| Probennummer | Diagnose | Geburtsdatum (Donor) |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| LPH001 | Neuroblastom | 1991 |
| LPH002 | Unklar | 1989 |
| LPH003 | Gesunder Donor | 1986 |
| LPH004 | Hodenkrebs (cryokonserviert) | 1964 |
| LPH005 | Hodenkrebs (cryokonserviert) | 1976 |
| LPH006 | Hodenkrebs (cryokonserviert) | 1962 |
| LPH007 | Hodenkrebs (cryokonserviert) | 1976 |

Tabelle II: CD44-spezifische Antikörper, die für die durchflußzytometrische Analyse verwendet wurden

| Spezifität | Klon | Subtyp | Modifikation | Für FACS-Analyse benutzte Konz. |
|------------|----------|-------------|--------------|---------------------------------|
| CD44v5 | VFF-8* | IgG1, murin | Biotin | 2.0 µg/ml |
| CD44v6 | VFF-18** | IgG1, murin | Biotin | 1.0 µg/ml |
| CD44v6 | VFF-18 | IgG1, murin | FITC | 2.5 µg/ml |
| CD44s | SFF-2*** | IgG1, murin | Biotin | 1.0 µg/ml |
| CD44s | SFF-2 | IgG1, murin | FITC | 2.5 µg/ml |

* WO95/00851; ** WO95/33771; *** Heider, KH, Ratschek M, Zatloukal K, Adolf GR.

, Virchows Arch 428:267-273, (1996).

Tabelle III: Expression von Standard- und variablen CD44-Antigenen auf CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen gemäß FACS-Analyse

10

| Quelle | Nabelschnurblut | | Leukapherese | | Knochenmark | |
|----------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| | Probenzahl | 8 | 7 | 4 | Mittel | Bereich (%) |
| Expression von | Mittel (%) | Bereich (%) | Mittel (%) | Bereich (%) | Mittel (%) | Bereich (%) |
| CD44s | 98.8 | 95.4 - 100.0 | 98.6 | 97.6 - 100.0 | 100.0 | --- |
| CD44v5 | 1.4 | 0.0 - 3.2 | 1.3 | 0.3 - 2.7 | 0.6 | 0.1 - 0.9 |
| CD44v6 | 3.6 | 1.9 - 8.1 | 1.8 | 1.1 - 2.7 | 1.5 | 0.3 - 2.4 |

15 **Beispiel 2: Reinigung von hämatopoetischen Stammzellen mit Immunotoxinen**

Herstellung von Immunotoxinen

Antikörper, die spezifisch für durch CD44v5 oder CD44v6 kodierte Epitope sind
20 (WO 95/00851 und WO 95/33771), können an *Pseudomonas* Exotoxin über eine Thioether-Bindung mit Sulfo-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclo-hexan-1-carboxylat (Pierce, Rockford, Illinois, USA) wie in der Literatur beschrieben konjugiert werden (34). In Abänderung der zitierten Methode können nach der Inkubation des reduzierten MAk und Maleimidomethylcyclohexan-1-carboxylat-(*Pseudomonas*-Exotoxin) bei 4°C über Nacht ein
25 gleiches Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung zugesetzt und die Präparation für eine

weitere Stunde inkubiert werden. Der gebildete Niederschlag kann durch Zentifugation bei 10.000 x g für 10 Min. gewonnen, in 1 ml PBS gelöst und der Gelfiltration unterworfen werden (35).

Fraktionen, die gereinigtes Konjugat enthalten, wie durch Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese festgestellt werden kann, werden vereinigt und in den Experimenten verwendet. Die Proteinkonzentration kann mit einem Bio-Rad Protein-Assay bestimmt werden, wobei Rindergammaglobulin als Standard benutzt werden kann.

10 Immunotoxinbehandlung

Präparationen mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut, Leukapheresematerial, oder Knochenmark (s. oben) oder CD34+-angereicherte Zellen aus diesen Quellen (s. oben) können verwendet werden. Sie können in Zellkulturmedium (RPMI 1640/FCS, Antibiotika) für 1 Stunde, 2 Stunden oder 20 Stunden bei 37°C mit 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml oder 1.0 µg/ml Immunotoxin inkubiert werden. Als Immunotoxine können CD44v5-oder CD44v6-Antikörper-*Pseudomonas*-Exotoxin-Konjugate oder eine Mischung beider verwendet werden. Die Zellen können vor der Inkubation suspendiert und während der Inkubation gerollt oder leicht geschüttelt werden. Nach der Inkubation können Zellen mit PBS/1% FCS oder Zellkulturmedium 2mal gewaschen und dann weiterverwendet werden. Die Effektivität der Behandlung kann in einem Koloniebildungsversuch getestet werden (4, s. auch Beispiel 3). Gegebenenfalls kann die Prozedur ein- oder zweimal wiederholt werden. Die Überlebensrate klonogener Vorläuferzellen kann ebenfalls gemäß der Methode in der zuletzt beschriebenen Literaturstelle gestestet werden (4, s. Beispiel 3).

Beispiel 3: Immunomagnetische Behandlung

Zur immunomagnetischen Reinigung mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut oder Leukapherese oder Knochenmark oder daraus angereicherter CD34+-Präparationen können immunomagnetische sphärische Träger (beads), z.B Dynabeads SAM ST (Dynal, Oslo, Norwegen) verwendet werden. Dies sind gleichförmige, magnetische Polystyrolträger, die mit kovalent oberflächengebundenem Schaf-anti-Maus-IgG beschichtet sind. Die SAM IgG-Antikörper binden alle Maus-IgG-Unterklassen. Entsprechend werden für dieses Experiment murine CD44-Antikörper verwendet (WO 95/00851, WO 95/33771). Die jeweilige Zellpräparation (z.B. 10⁶ bis 10⁸ Zellen) können für 30 Min. bei 4°C in Plastikröhren in 1

ml RPMI 1640 (mit Supplementen) mit CD44v5-und/oder CD44v6-MAKs (jeweils 10 µg jeden Antikörpers) inkubiert werden. Die Röhrchen können während der Inkubation gerollt oder geschüttelt werden. Die Zellen können zweimal mit PBS/1% FCS gewaschen werden. Dann können die immunomagnetischen Träger, suspendiert in 0.5 ml Medium, zugegeben und unter Rollen oder Schütteln für 30 Min. bei 4°C inkubiert werden. Dabei kann ein Träger/Zellverhältnis von 50:1 eingestellt werden. Die Tumorzellen können dann aus der Mischung entfernt werden, wobei ein flacher Kobalt-Samarium-Magnet verwendet werden kann (36). Die Effektivität der Reinigungsprozedur kann durch Untersuchung der verbleibenden klonogenen Tumorzellen oder Knochenmarksstammzellen in der Suspension durch Koloniebildungs-Assays bestimmt werden. Gegebenenfalls kann ein Wiederholungszyklus der immunomagnetischen Separation durchgeführt werden.

Koloniebildende Assays für Tumor- und Knochenmarksvorläufer-Zellen

Die Zahl der koloniebildenden Tumorzellen kann in einem Softagarassay untersucht werden (37, 38). Softagar-Kulturen werden dreifach in 10-ml-Röhrchen angesetzt, in die 0.2 ml August-Rattenblutzellen (1:8 verdünnt), 0.2 ml entsprechend verdünnter Testzellsuspension, und 0.6 ml 0.5 %igem Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) gegeben werden. Die Röhrchen können bei 37°C in 5% O₂/5 % CO₂ /90 % N₂ inkubiert werden. 21 Tage nach Inkubation werden Kolonien mit mehr als 50 Zellen unter Benutzung eines Zeiss Stereomikroskops gezählt.

Die lebensfähigen klonogenen Vorläuferzellen können in einer modifizierten Version (36) der Methode von Burgess A.W. et al. (39) gemessen werden. Die Testzellpräparation wird in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro ml, in McCoy's 5A Medium suspendiert, das 0.3 % Agar, 15 % FCS, 20 ng/ml rekombinanten menschlichen GM-CSF, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 Einheiten Streptomycin/ml Medium enthält. Die GM-CSF-Konzentration, die verwendet wird, kann auf der Basis von Titrationsexperimenten bestimmt werden. Jeweils 3 1-ml-Aliquots werden in 35-mm-Zellkulturschalen bei 37°C und 5% CO₂, in Luft für 14 Tage inkubiert, und Kolonien mit mehr als 40 Zellen gezählt.

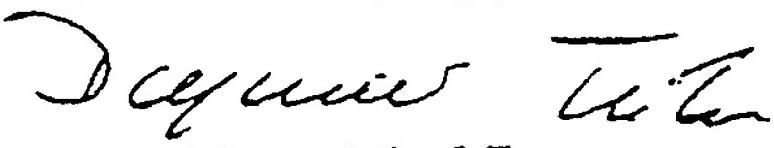
BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN;
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Boehringer Ingelheim Int. GmbH

Postfach 200
55216 Ingelheim am Rhein

LEBENSFAHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

| I. HINTERLEGER | II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS |
|--|---|
| Name: Boehringer Ingelheim Int. GmbH Anschrift: Postfach 200 55216 Ingelheim am Rhein | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2174 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 1994-06-07 |
| III. LEBENSFAHIGKEITSBESCHEINIGUNG | |
| Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1994-06-07 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus | |
| <input checked="" type="checkbox"/> ³ lebensfähig <input type="checkbox"/> ³ nicht mehr lebensfähig | |
| IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFAHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFUHRT WORDEN IST ⁴ | |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE | |
| Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1994-06-17 |

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

³ Zutreffendes ankreuzen.

⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Boehringer Ingelheim Int. GmbH

Postfach 200
55216 Ingelheim am Rhein

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

| | |
|--|---|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS | |
| Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezeichnungszeichen: VFF-18 | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2174 |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG | |
| <p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>(<input type="checkbox"/>) eine wissenschaftliche Beschreibung (<input type="checkbox"/>) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p> | |
| III. EINGANG UND ANNAHME | |
| <p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1994-06-07 (Datum der Ersthinterlegung)¹ eingegangen ist.</p> | |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG | |
| <p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p> | |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE | |
| <p>Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p> | <p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>Dagmar Cöller</i></p> <p>Datum: 1994-06-17</p> |

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

Literatur

1. Shpall EJ, Jones RB, Release of tumor cells from bone marrow, Blood 1994, 83:623-625.
2. Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. Blood 1993, 82: 2605-2610.
3. Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R, Kanz L. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. Blood 1994, 83: 636-640.
4. Myklebust AT, Godal A, Juell S, Pharo A, Fodstad O. Comparison of two antibody based methods for elimination of breast cancer cells from human bone marrow. Cancer Res 1994, 54:209-214.
5. Grossbard ML, Nadler LM. Immunotoxin therapy of malignancy. Important Adv Oncol 1992, 111-135.
6. Myklebust AT, Godal A, Pharo A, Juell S, Fodstadt O. Eradication of small cell lung cancer cells from human bone marrow with immunotoxins. Cancer Res 1993, 53: 3784-3788.
7. Wunder E, Sovalat H, Henson P, Serke S, ED. Hematopoietic stem cells. The multi-house manual. Dayton, Ohio, USA: AlphaMedPress 1994:324.; vol 1).
8. Rall CJN, Rustigi AK. CD44 isoforms expression in primary and metastatic pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res 1995, 55: 1831-1835.
9. Cannistra SA, Abu-Jawdeh G, Niloff J, et al. CD44 variant expression is a common feature of epithelial ovarian cancer: lack of association with standard prognostic factors. J Clin Oncol 1995, 13: 1912-1921.
10. Manten-Horst E, Danen EHJ, Smit L, et al. Expression of CD44 splice variants in human cutaneous melanoma and melanoma cell lines is related to tumor progression and metatatic potential. Int J Cancer (Pred. Oncol.) 1995, 64: 182-188.

11. Stauder R, Eisterer W, Thaler J, Günthert U. CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood* 1995, 85: 2885-2899.
12. Griffioen AW, Horst E, Heider KH, et al. Expression of CD44 splice variants during lymphocyte activation and tumor progression. *Cell Adhes Commun* 1994, 2: 195-200.
13. Hofmann M, Rudy W, Zöller M, et al. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* 1991, 51: 5292-5297.
14. Matzku S, Wenzel A, Lius, Zöller M. Antigenic differences between metastatic and nonmetastatic BSp73 rat tumor variants characterized by monoclonal antibodies. *Cancer res* 1989, 49: 1294-1299.
15. Pals ST, Koopmann G, Heider K-H, et al. CD44 splice variants: expression during lymphocyte activation and tumor progression. *Behring Inst. Mitt.* 1993, 92: 273-277.
16. Günthert U, Hofmann M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991, 65: 13-24.
17. Koopman G, Heider K, Horst E, et al. Activated human lymphocytes and aggressive non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant CD44. *J Exp Med* 1993, 199:897-904.
18. Kaufmann M, Heider K-H, Peter H-P, Mickwitz G, Ponta H, Herrlich P. CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet* 1995, 345: 615-619.
19. Han H-J, Ho L-I, Chang J-Y, et al. Differential expression of the human metastasis adhesion molecule CD44v in normal and carcinomatous stomach mucosa of Chinese subjects. *Cancer* 1995, 75: 1065-1071.
20. Mulder J-W, Kruijt PM, Sewnath M, et al. Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet* 1994, 344: 1470-1472.

21. Arch R, With K, Hofmann M, Ponta H, Matzku S, Zöller M. Participation of a metastasis-inducing splice variant of CD44 in normal immune response. *Science* 1992, 257: 682-685.
22. Seiter S, Arch R, Reber S, et al. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 1993, 177: 443-455.
23. Miltenyi S, Guth S, Radbruch A, Pflüger E, Thiel A. Isolation of CD34+ hematopoietic progenitor cells by high-gradient magnetic cell sorting (MACS). In: *Hematopoietic stem cells: The mulhouse manual*. Dayton, OH, USA: AlphaMedPress, 1994, pp. 201-213.
24. Miltenyl S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990, 11: 231-238.
25. Herrlich P, Zöller M, Pals ST, Ponta H. CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol today* 1993, 14: 395-399.
26. Hofmann M, Rudy W, Günthert U, et al. A link between ras and metastatic behavior of tumor cells: ras induces CD44 promotor activity and leads to low-level expression of metastasis-specific variants of CD44 in CREF cells. *Cancer Res* 1993, 53: 516-521.
27. Heider, K.-H., Hofmann, M., Horst, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S.T. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J. Cell Biol.* 120: 227-233 (1993).
28. Catty, D (Hrsg). *Antibodies Vols. I und II*. IRL Press Oxford (1989).
29. Tölg, C., Hofmann, M., Herrlich, P., and Ponta, H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids. Res.* 21: 1225-1229 (1993).
30. Screamton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., and Bell, J. I. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 12160-12164 (1992).

31. Friedmann P N, McAndrew S J, Gawlak S L, Chace D, Trail P A, Brown J P, Siegall C B. BR96 sFv-PE40, a potent single-chain immunotoxin that selectively kills carcinoma cells. *Cancer Res.* 53: 334-339 (1993).
- , 32. Chaudhary V K, Batra J K, Galdo M G, Willingham M C, Fitzgerald D J, Pastan I. A rapid method of cloning functional variable-region antibody genes in *Escherichia coli* as single-chain immunotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 1066 (1990).
- , 10 33. Schrappe M, Bumol T F, Apelgren L D, Briggs S L, Koppel G A, Markowitz D D, Mueller B M, Reisfeld R A. Long-term growth suppression of human glioma xenografts by chemoimmunoconjugates of 4-desacetylvinblastine-3-carboxyhydrazide and monoclonal antibody 9.2.27. *Cancer Res.* 52: 3838-3844 (1992).
- , 15 34. Godal A. et al. Immunotoxins directed against the high molecular weight Melanoma Associated Antigen. Identification of potent antibody-toxin Combinations. *Int. J. Cancer* 52:631-635 (1992).
- , 20 35. Godal, A. Human melanoma cell lines showing striking inherent differences in sensitivity to immunotoxin containing holotoxins. *J. Natl. Cancer Inst.* 77:1247-1253 (1986).
- , 25 36. Kvalheim G. et al. Elimination of B-lymphoma cells from human bone marrow: model experiments using monodisperse magnetic particles coated with primary monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 47: 846-851 (1987).
- . 37. Courtenay VD. et al. An in vitro colony assay for human tumors grown in immune-suppressed mice and treated in vivo with cytotoxic agents. *Br. J. Cancer* 37:261-268 (1978).
- , 30 38. Fodstad, O. et al. Activity of mitozolomide (NSC 353451), a new imidazotetrazine, against xenografts from human melanomas, sarcomas, and lung and colon carcinomas. *Cancer Res.* 45: 1778-1786 (1985).
- , 35 39. Burgess A.W. et al. Stimulation by human placental conditioned medium of hematopoietic colony formation by human marrow cells. *Blood*, 49: 573-583 (1977).

Patentansprüche

1. Verwendung eines für variantes CD44 spezifischen Antikörpermoleküls zur selektiven Entfernung von Tumorzellen aus einer Zellpräparation, die hämatopoetische Stamm- und/oder Vorläuferzellen enthält.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die hämatopoetischen Stamm- und/oder Vorläuferzellen CD34 auf ihrer Oberfläche exprimieren.
3. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Antikörpermolekül spezifisch für ein Epitop ist, das durch das variante Exon v5 oder das variante Exon v6 des CD44 Gens kodiert wird.
4. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Antikörpermolekül ein monoklonaler Antikörper oder ein Fragment eines monoklonalen Antikörpers ist.
5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Antikörpermolekül der monoklonale Antikörper VFF-18 (DSM2174) oder ein Fragment dieses Antikörpers ist.
6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Antikörpermolekül durch rekombinante Expression hergestellt wurde.
7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Antikörpermolekül mit einem zytotoxischen Agens verknüpft ist.
8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das zytotoxische Agens ein Toxin ist.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Toxin das *Pseudomonas*-Exotoxin ist.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Toxin mit dem Antikörpermolekül kovalent verknüpft wird oder durch rekombinante Expression eines Antikörper-Toxin Fusionsproteins hergestellt wird.

11. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellpräparation aus Knochenmark, peripherem Blut, Nabelschnurblut oder Leukapheresematerial erhalten wird.
- , 12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellpräparation eine Zellpräparation ist, in der CD34+ -Zellen angereichert wurden.
13. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen auf einem festen Träger immobilisiert werden.
10
14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß dieser Träger magnetisch ist.
- , 15. Verfahren zur Entfernung von Tumorzellen aus einer Zellpräparation, die hämatopoetische Stamm- und/oder Vorläuferzellen enthält, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellpräparation mit einem für variantes CD44 spezifischen Antikörpermolekül in Kontakt gebracht wird.
15
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Antikörpermolekül mit einem zytotoxischen Agens verknüpft ist.
20
17. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß zur Entfernung der Tumorzellen ein fester Träger verwendet wird.
- , 18. Zellpräparation erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 15-17.
25
19. Verwendung einer Zellpräparation gemäß Anspruch 18 zur Transplantation.

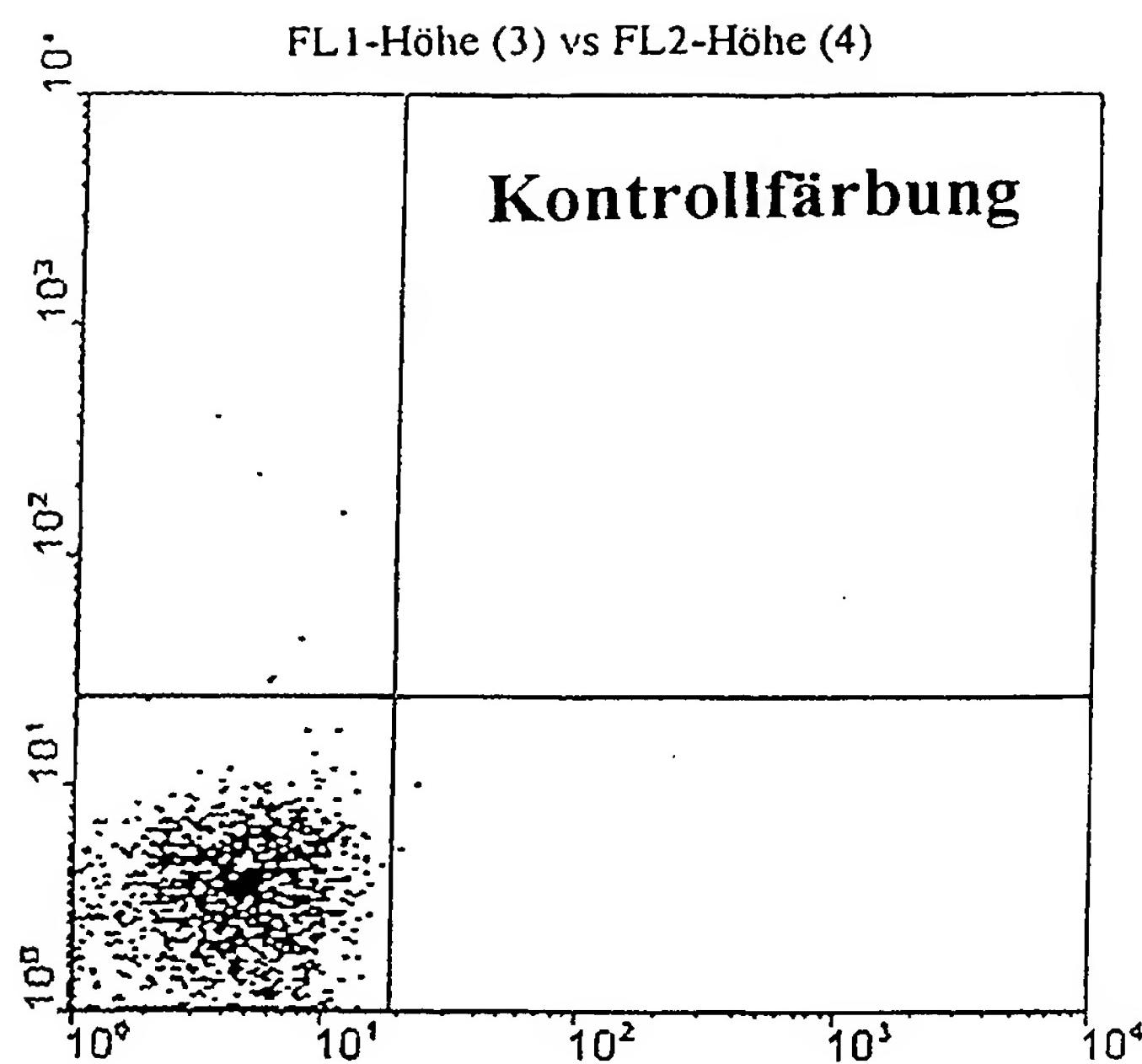


Fig. 1a

2/9

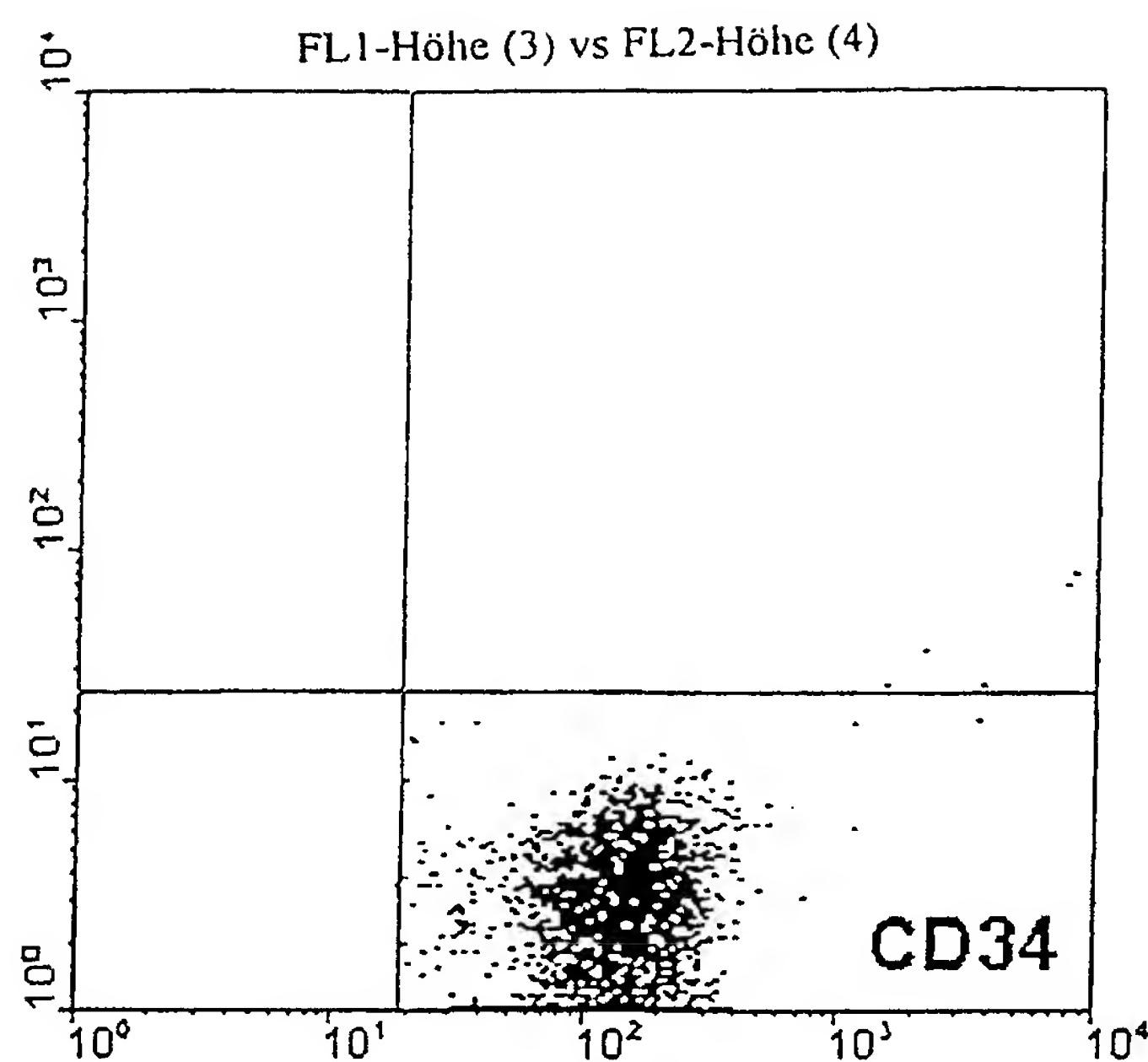


Fig. 1b

3/9

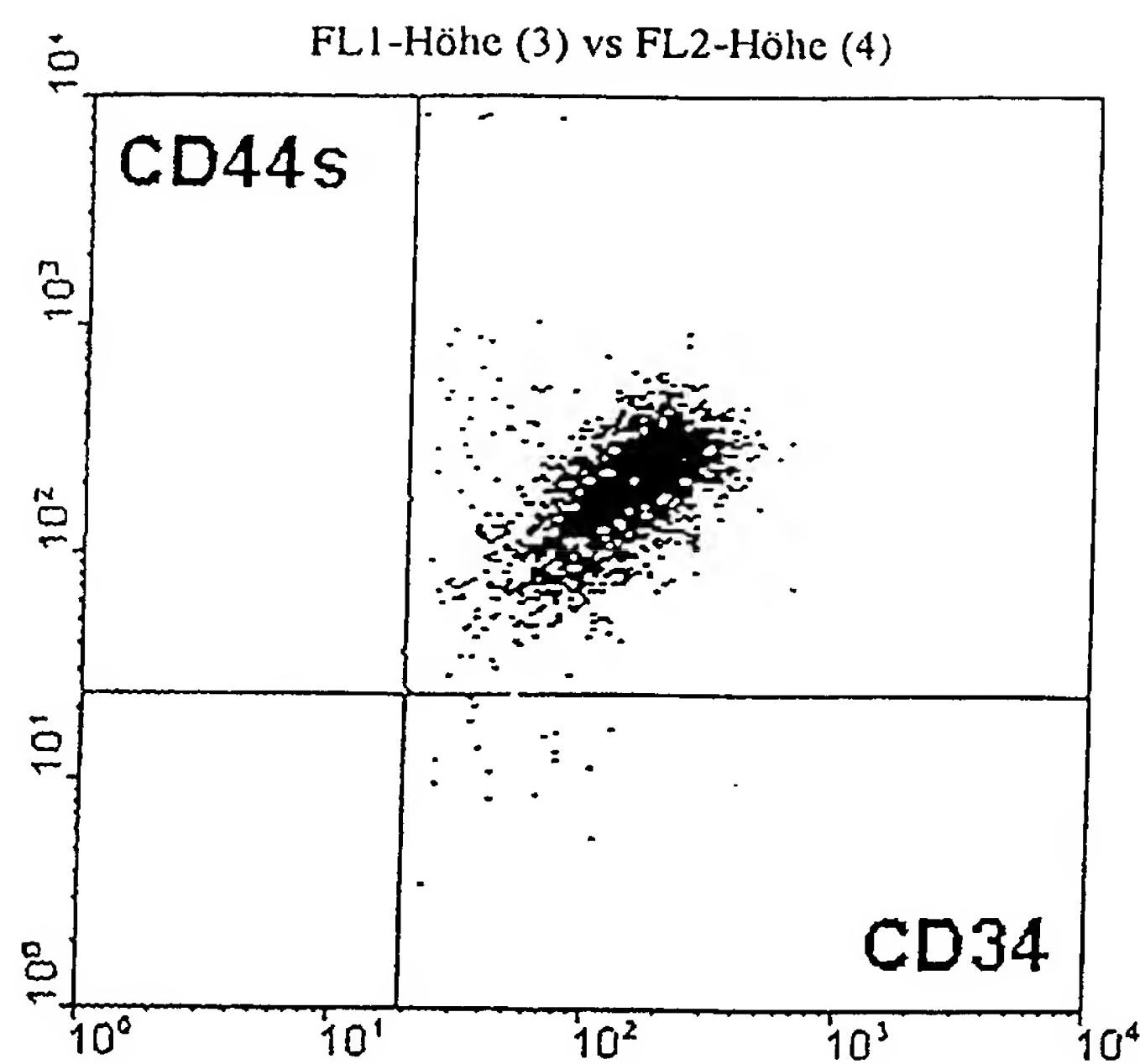


Fig. 1c

4/9

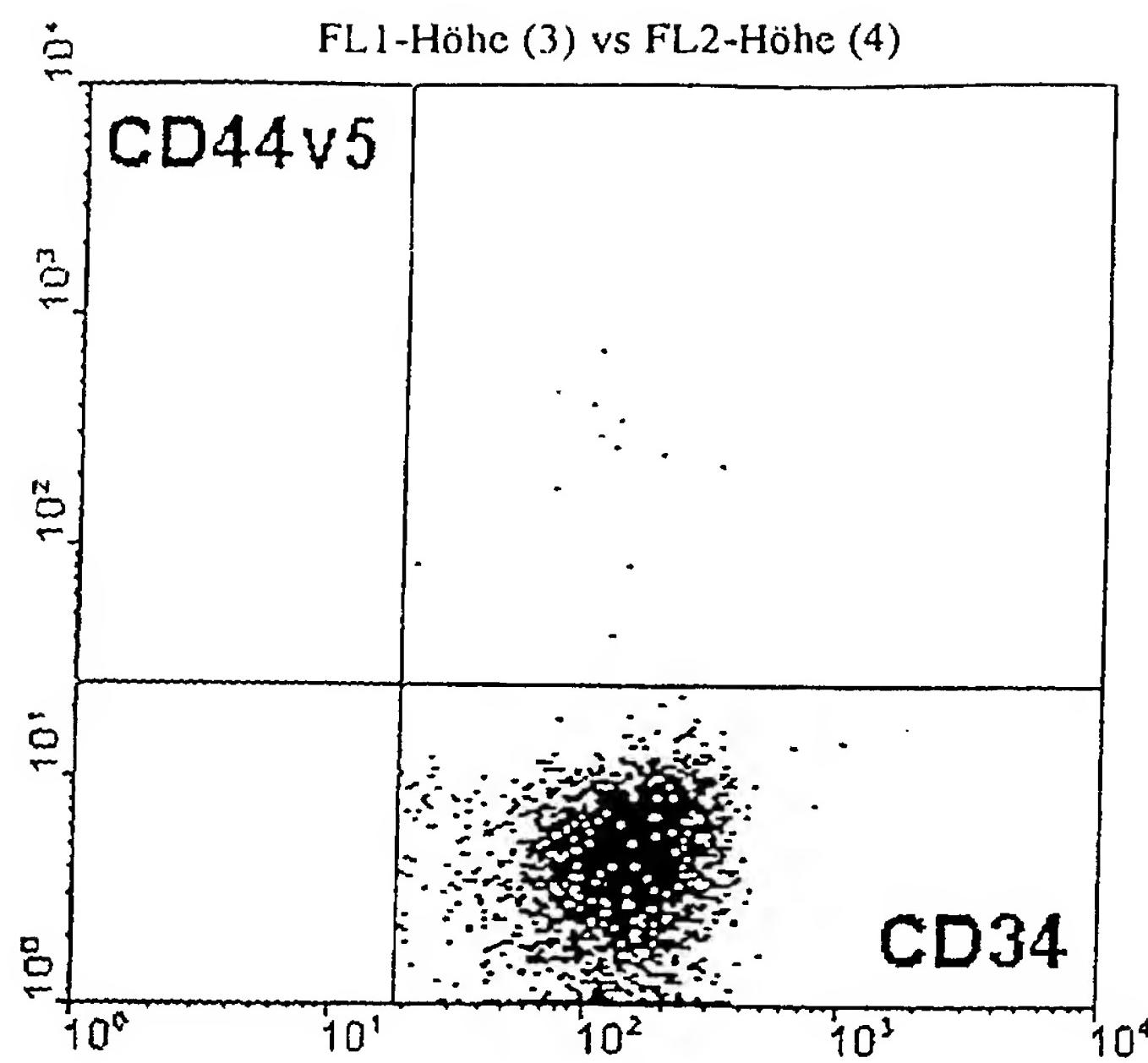


Fig. 1d

5/9

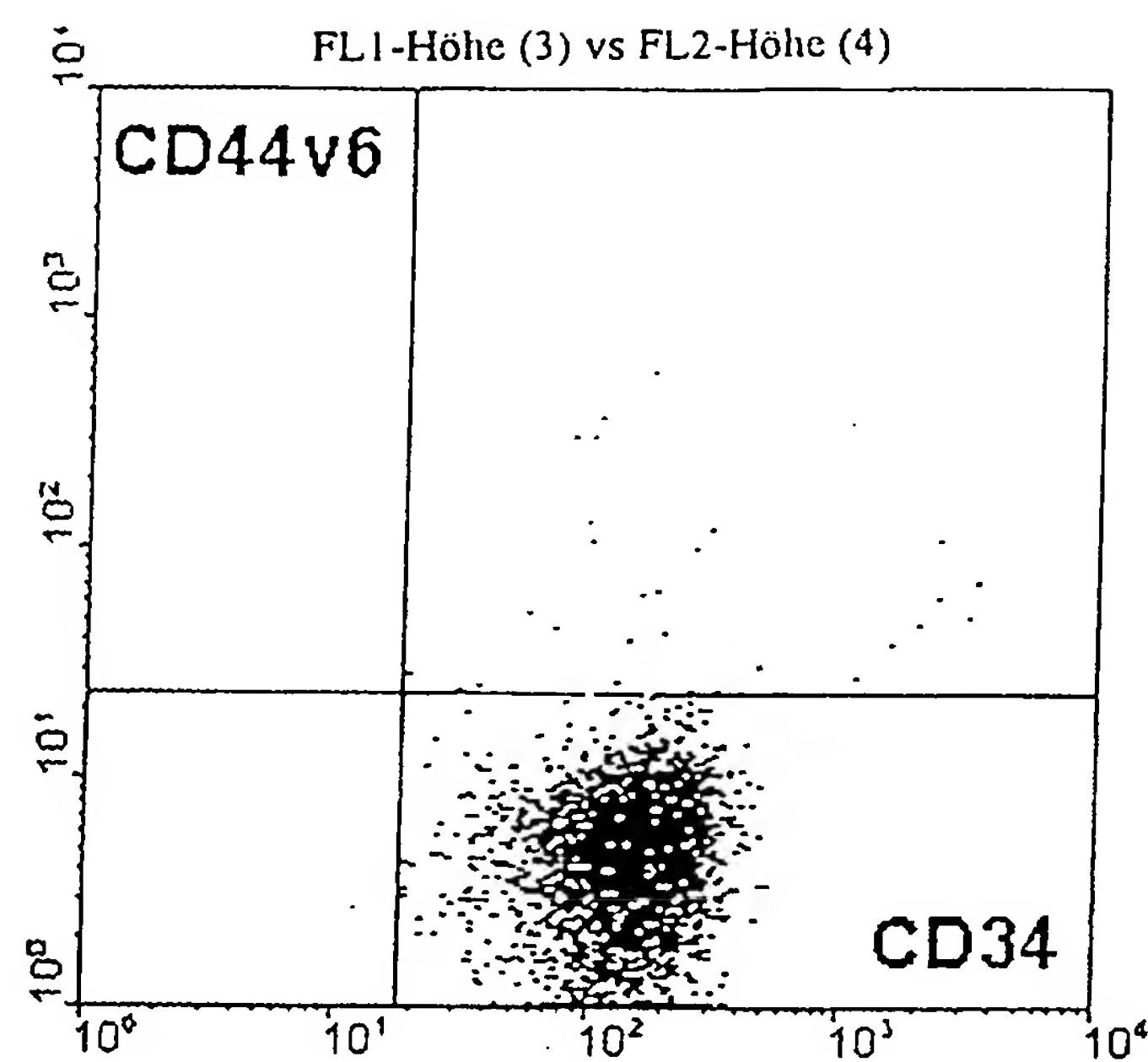


Fig. 1e

6/9

FSC-Höhe (1) vs SSC-Höhe (2)

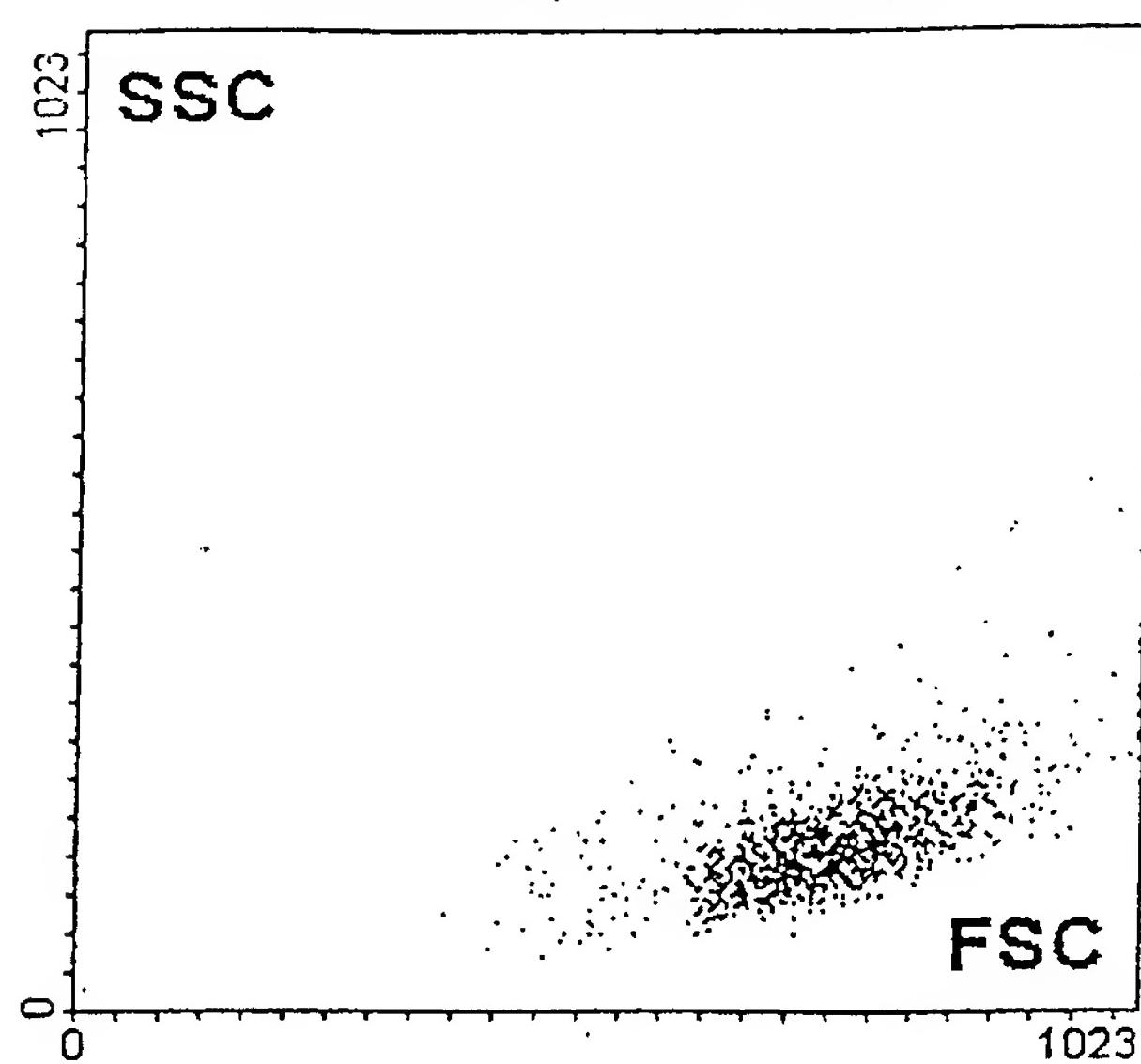


Fig. 2

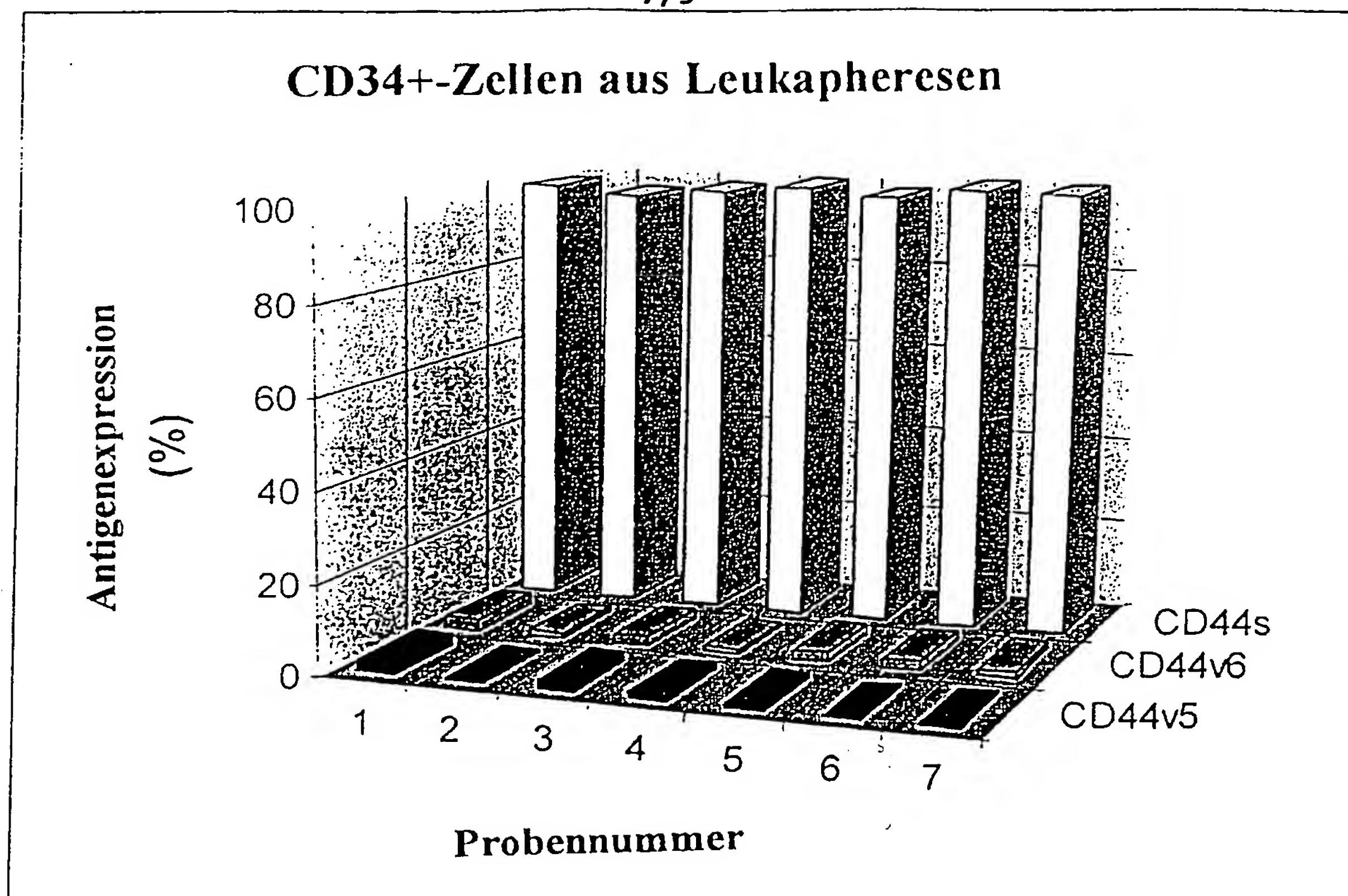


Fig. 3

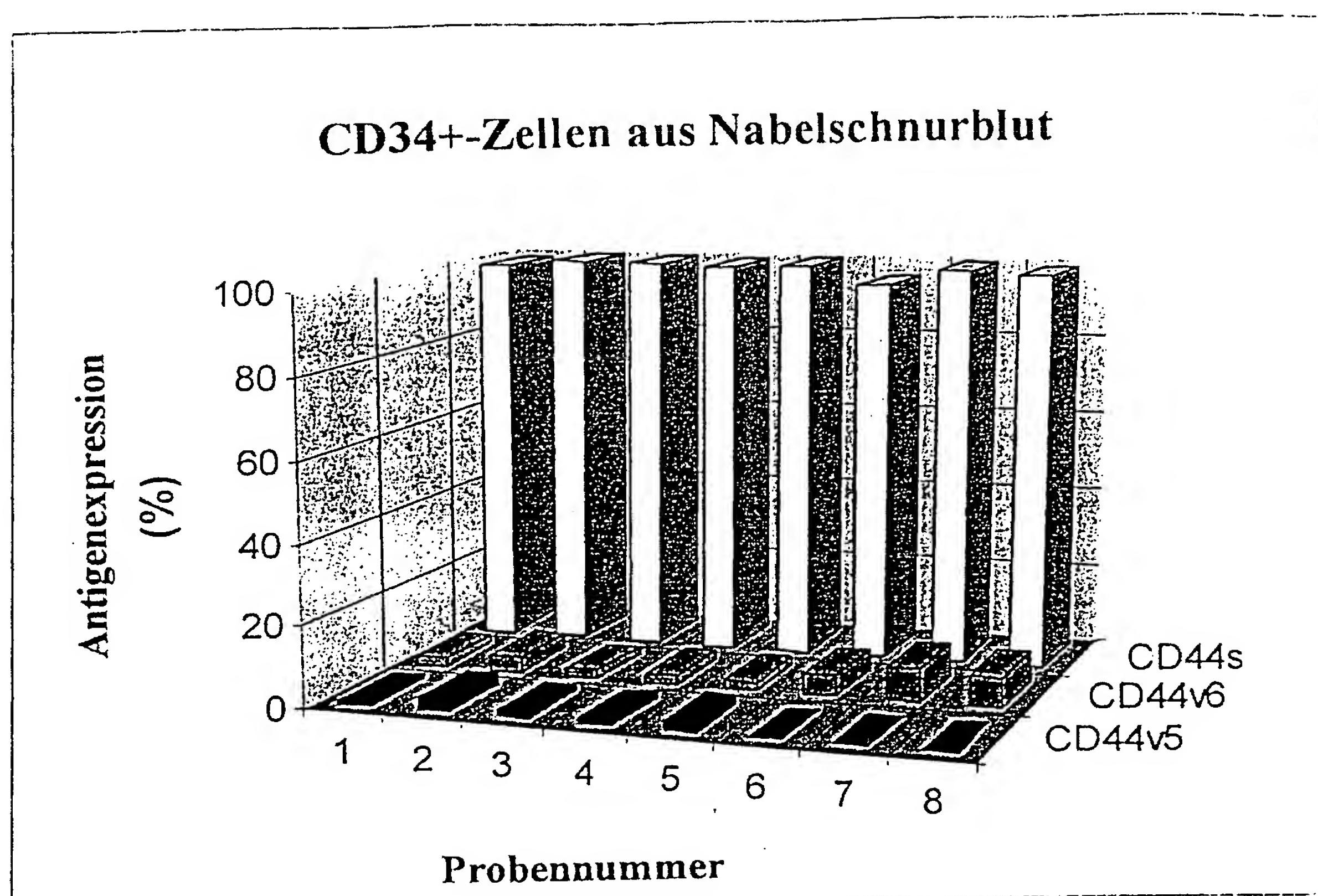


Fig. 4

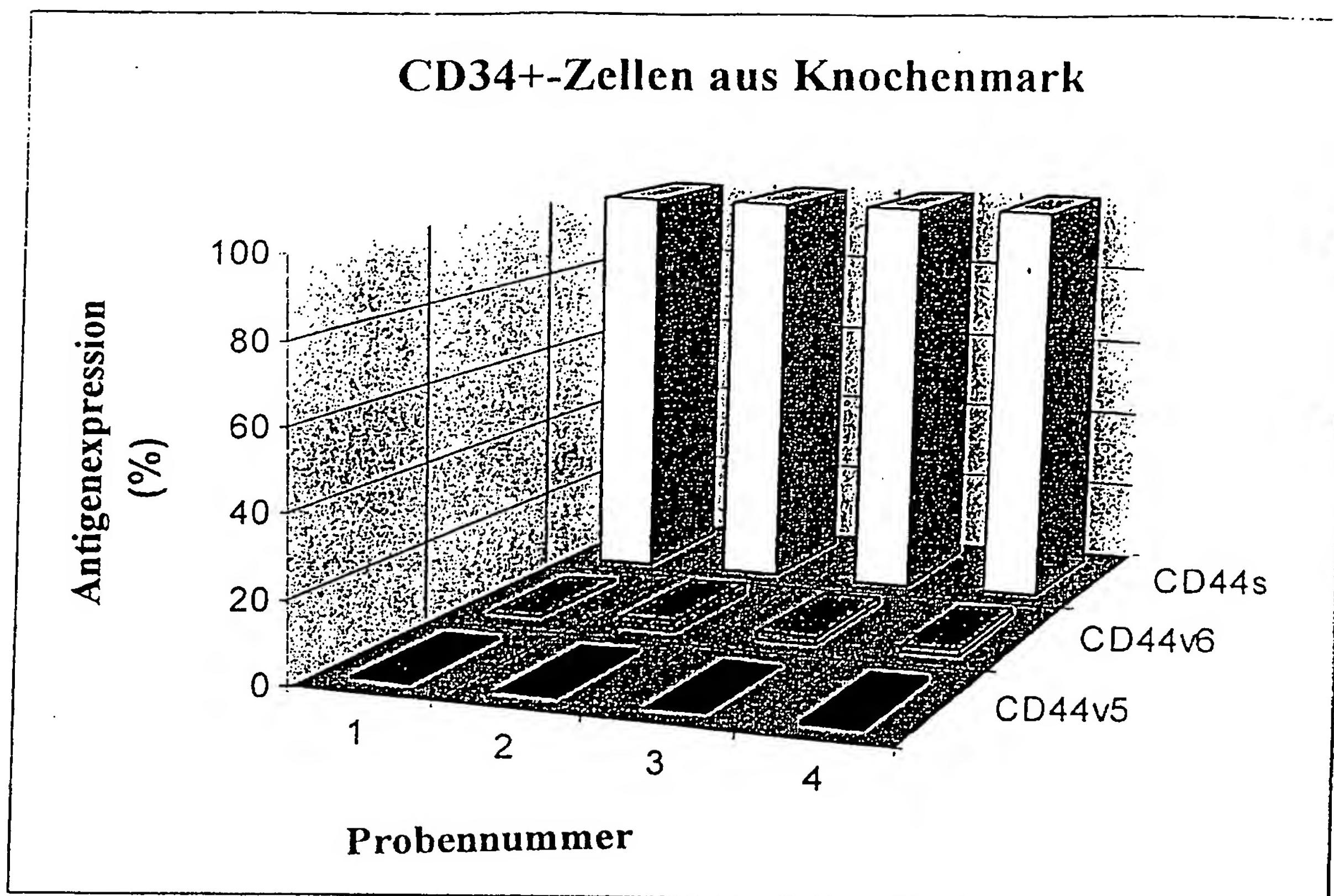


Fig. 5

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|--|----|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 39/395, 47/48, C12N 5/06, 5/08, A61K 35/14 | A3 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/22508 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Mai 1998 (28.05.98) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/06382 | | (81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 15. November 1997 (15.11.97) | | |
| (30) Prioritätsdaten: 196 48 209.7 21. November 1996 (21.11.96) DE | | Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; D-55216 Ingelheim am Rhein (DE). | | (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 30. Juli 1998 (30.07.98) |
| (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HANDGRETINGER, Rupert [DE/DE]; Klopstockweg 16, D-72076 Tübingen (DE). NEU, Stefan [DE/DE]; Theodor-Heuss-Strasse 9, D-72108 Rottenburg (DE). | | |
| (74) Anwälte: LAUDIEN, Dieter usw.; Boehringer Ingelheim GmbH, A Patente, Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE). | | |

(54) Title: PROCESS FOR TUMOUR CELL DEPLETION OF CD34-POSITIVE CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR TUMORZELLDEPLETION CD34-POSITIVER ZELLEN

(57) Abstract

A process for selectively eliminating (purging) tumour cells from preparations containing CD34-positive cells using CD44-specific antibodies is disclosed. The invention is based on the surprising discovery that CD34-positive cells, unlike many tumour cells, do not express the variant exons CD44v5 and CD44vt, or only to a very minor extent. A new molecular marker is thus provided by means of which tumour cells that contaminate strain cell preparations can be selectively destroyed. To destroy tumour cells, CD44v-specific antibody molecules can be linked to a cytotoxic agent, for example the exotoxin of the species *pseudomonas*.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur selektiven Entfernung (purging) von Tumorzellen aus Präparationen, die CD34-positive Zellen enthalten, mit Hilfe CD44-spezifischer Antikörper. Diese Aufgabe konnte auf Grundlage des überraschenden Befundes gelöst werden, daß CD34-positive Zellen im Gegensatz zu vielen Tumorzellen die varianten Exons CD44v5 und CD44v6 nicht oder in sehr geringem Maße exprimieren. Damit wird ein neuer molekularer Marker bereitgestellt, mit dessen Hilfe kontaminierende Tumorzellen in Stammzellpräparationen selektiv zerstört werden können. Zur Zerstörung der Tumorzellen können CD44v-spezifische Antikörpermoleküle mit einem zytotoxischen Agens verknüpft werden, beispielsweise mit dem Exotoxin der Gattung *Pseudomonas*.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/06382

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K39/395 A61K47/48 C12N5/06 C12N5/08 A61K35/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A | WO 95 33771 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 14 December 1995 cited in the application see examples see claims --- | 1-19 |
| A | DE 43 26 573 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 23 February 1995 see the whole document --- | 1-19 |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 May 1998

Date of mailing of the international search report

10. 06. 1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/06382

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| A | K. HEIDER ET AL.: "Splice variants of the cell surface glycoprotein CD44 associated with metastatic tumour cells are expressed in normal tissues of humans and Cynomolgus monkeys." EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, vol. 31A, no. 13/14, December 1995, GB, pages 2385-2391, XP000644485 see the whole document --- | 1-19 |
| A | S. LEGRAS ET AL.: "CD44 alternative splicing in normal human myelopoiesis and its dysregulation in acute myeloblastic leukemia (AML)." PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, vol. 36, March 1995, VSA, page 465 XP002065331 see abstract 2767 --- | 1-19 |
| P,X | S. NEU ET AL.: "Expression of CD44 isoforms by highly enriched CD34-positive cells in cord blood, bone marrow and leukaphereses." BONE MARROW TRANSPLANTATION, vol. 20, no. 7, October 1997, BASINGSTOKE, GB, pages 593-598, XP002065332 see the whole document ----- | 1-19 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP 97/06382**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claim 19 refers to a process for treating the human/animal body, the search was carried out and was based on the claimed effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/06382

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|--|--|--|
| WO 9533771 | A 14-12-1995 | DE AU BG BR CA CZ EP FI HU JP NO PL SK ZA | 4431297 A 2737095 A 101024 A 9507964 A 2192370 A 9603591 A 0765343 A 964845 A 76260 A 10501797 T 965239 A 317536 A 154896 A 9504678 A | 07-03-1996 04-01-1996 30-09-1997 02-09-1997 14-12-1995 12-11-1997 02-04-1997 04-12-1996 28-07-1997 17-02-1998 06-12-1996 14-04-1997 06-08-1997 08-12-1995 |
| DE 4326573 | A 23-02-1995 | AU CA WO EP | 7459894 A 2168988 A 9504547 A 0713398 A | 28-02-1995 16-02-1995 16-02-1995 29-05-1996 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/06382

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K39/395 A61K47/48 C12N5/06 C12N5/08 A61K35/14

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | WO 95 33771 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 14. Dezember 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Beispiele siehe Ansprüche --- | 1-19 |
| A | DE 43 26 573 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 23. Februar 1995 siehe das ganze Dokument --- | 1-19 -/- |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld O zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Mai 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10. 06. 1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Nooij, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/06382

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie° | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | K. HEIDER ET AL.: "Splice variants of the cell surface glycoprotein CD44 associated with metastatic tumour cells are expressed in normal tissues of humans and Cynomolgus monkeys." EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, Bd. 31A, Nr. 13/14, Dezember 1995, GB, Seiten 2385-2391, XP000644485 siehe das ganze Dokument --- | 1-19 |
| A | S. LEGRAS ET AL.: "CD44 alternative splicing in normal human myelopoiesis and its dysregulation in acute myeloblastic leukemia (AML)." PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, Bd. 36, März 1995, VSA, Seite 465 XP002065331 siehe Zusammenfasung 2767 --- | 1-19 |
| P,X | S. NEU ET AL.: "Expression of CD44 isoforms by highly enriched CD34-positive cells in cord blood, bone marrow and leukaphereses." BONE MARROW TRANSPLANTATION, Bd. 20, Nr. 7, Oktober 1997, BASINGSTOKE, GB, Seiten 593-598, XP002065332 siehe das ganze Dokument ----- | 1-19 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/06382

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht rechbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl Anspruch 19 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle rechbarbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. Da für alle rechbarbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/06382

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | | Datum der Veröffentlichung |
|---|----------------------------|--------------------------------|------------|----------------------------|
| WO 9533771 A | 14-12-1995 | DE | 4431297 A | 07-03-1996 |
| | | AU | 2737095 A | 04-01-1996 |
| | | BG | 101024 A | 30-09-1997 |
| | | BR | 9507964 A | 02-09-1997 |
| | | CA | 2192370 A | 14-12-1995 |
| | | CZ | 9603591 A | 12-11-1997 |
| | | EP | 0765343 A | 02-04-1997 |
| | | FI | 964845 A | 04-12-1996 |
| | | HU | 76260 A | 28-07-1997 |
| | | JP | 10501797 T | 17-02-1998 |
| | | NO | 965239 A | 06-12-1996 |
| | | PL | 317536 A | 14-04-1997 |
| | | SK | 154896 A | 06-08-1997 |
| | | ZA | 9504678 A | 08-12-1995 |
| <hr/> | | | | |
| DE 4326573 A | 23-02-1995 | AU | 7459894 A | 28-02-1995 |
| | | CA | 2168988 A | 16-02-1995 |
| | | WO | 9504547 A | 16-02-1995 |
| | | EP | 0713398 A | 29-05-1996 |
| <hr/> | | | | |